

# 博 士 論 文 概 要

## 論 文 題 目

Molecular analysis and ecological control of denitrifying bacterial  
population in wastewater treatment system  
排水処理プロセスにおける脱窒細菌群集の分子生態解析と生態制御

申 請 者

Toshifumi	Osaka
大坂	利文

応用化学専攻      化学工学研究

2 0 0 7 年 1 2 月

生活排水や産業廃水の生物学的窒素除去プロセスの安定化ならびに高度化を図るうえで、従来ブラックボックスとされてきた生物反応槽の生態を理解することは不可欠である。排水処理微生物生態解析においては、硝化工程を担う細菌の個体群動態解析が精力的に行われてきた。この理由としては、増殖速度が遅い化学独立栄養性細菌群が担う硝化反応が窒素除去プロセスにおいて律速過程であることや、硝化細菌に限られた細菌種で構成されることから 16S rRNA 遺伝子配列情報などを利用するうえで比較的容易な解析対象であったことなどが挙げられる。一方、脱窒工程は、硝化工程と同様に生物学的窒素除去プロセスにおいて重要な位置づけにあるが、脱窒細菌が系統分類的に多岐に渡る細菌で構成されることから 16S rRNA アプローチで脱窒生態を特異的に解析することは困難であり、脱窒工程を実際に担う細菌群の生態については未解明な点が多いのが現状である。

脱窒反応は、電子供与体を有機物とする従属栄養性脱窒と硫黄やアンモニアなどを電子供与体とする独立栄養性脱窒に大別できる。現在の生物学的窒素除去プロセスにおいては、排水に含まれる有機物を電子供与体として利用する従属栄養性脱窒法が主流である。しかし、無機性排水、および循環型硝化・脱窒プロセスにおける 2 次脱窒槽流入水など有機物が不足する排水からの脱窒を達成するためには、メタノールや酢酸ナトリウムなどの薬剤添加による炭素／窒素比の調整といった維持管理が必要となる。一方、薬剤コスト削減および資源循環といった観点から、嫌気生物反応槽で発生するバイオガス（メタン）を電子供与体として利用するメタン脱窒法も考案されている。しかしながら、電子供与体補填のための調整薬剤がどのような微生物に利用されているかについては不明のままである。

上記の点を踏まえて、本論文では、生物学的窒素除去プロセスの脱窒工程を担う微生物の生態について解析することを目的とする。具体的には、脱窒反応に伴う炭素の同化反応を利用した生物活性や脱窒酵素遺伝子群を指標とした生物機能を同時に評価できる生態解析手法として stable-isotope probing (SIP) 法や様々な分子生物学的アプローチにより排水処理プロセスに関わる脱窒生態系を明らかにした。

本論文は、6 章より構成されている。以下に各章の概要を述べる。

第 1 章では、生物学的窒素除去プロセスに関する微生物群および自然環境中などにおける脱窒生態系について、過去の研究動向を整理して、本研究の研究背景をまとめ、意義および目的を述べた。

第 2 章では、酢酸ナトリウムおよびメタノールを資化する微生物群の特定を目的として、 $^{13}\text{C}$ -酢酸ナトリウムおよび  $^{13}\text{C}$ -メタノールを唯一の炭素源とする硝酸塩含有培地を用いて下水処理場の活性汚泥の回分培養を行い、SIP 解析を行った。まず脱窒培養により得られた汚泥から DNA を抽出し、塩化セシウム平衡密度勾配遠心分離を行ったところ、各系ともに  $^{13}\text{C}$ -DNA を分離・回収することができ、酢酸ナトリウムおよびメタノール由来の  $^{13}\text{C}$  が DNA 中に取り込まれていることを確認した。つぎに、獲得した  $^{13}\text{C}$ -DNA 画分について、16S rRNA 遺伝子のクロ

ーンライブラリーを作成し、系統解析を行った。その結果、活性汚泥に生息する主要な酢酸資化性脱窒細菌は、*Comamonadaceae* 科（*Acidovorax* 属、*Comamonas* 属）、*Rhodocyclaceae* 科（*Thauera* 属、*Dechloromonas* 属）および *Rhodobacteraceae* 科（*Paracoccus* 属）であり、また酢酸資化能は系統学的に多岐にわたることも明らかとなった。一方、主要なメタノール資化性脱窒細菌としては、メチロトロフ微生物として知られている *Hyphomicrobiaceae* 科、*Methylophilaceae* 科が特定され、また非常に多様性に乏しい細菌群集組成であった。SIP 法の導入により、複合微生物系の状態で基質利用特性などの代謝機能の解析が可能となり、電子供与体の違いが微生物群集構造や多様性に大きな影響を与えることが明らかとなった。

第3章では、脱窒に関わる機能遺伝子を指標とした微生物群集構造解析を行った。これまでに多種多様な細菌が脱窒能を持つことが知られており、細菌分類の指標である 16S rRNA 遺伝子配列に基づいた解析のみでは、検出された微生物が脱窒細菌であるかどうか明らかにできない。この問題点は、第2章で SIP 法を導入した 16S rRNA 遺伝子解析においても懸念され、獲得した  $[^{13}\text{C}]$ -DNA 画分に含まれる微生物群全てが硝酸（亜硝酸）呼吸により、酢酸ナトリウムおよびメタノールを資化した脱窒細菌とは限らない。そこで、酢酸ナトリウムまたはメタノールを利用する微生物群から脱窒細菌群集を評価するために、各系の  $[^{13}\text{C}]$ -DNA 画分に対して、亜硝酸還元酵素遺伝子（*nirS* および *nirK*）を指標とする系統解析を行った。酢酸資化性の微生物群集からは、*Thauera* 属の *nirS* に近縁な *nirS* クローンや、*Pseudomonas* 属、*Mesorhizobium* 属、*Alcaligenes* 属などに比較的近縁な *nirK* クローンが検出された。一方、メタノール資化性の微生物群集からは、*Hyphomicrobium* 属に近縁な *nirK* クローン以外が検出された。しかしながら、各  $[^{13}\text{C}]$ -DNA 画分から検出された *nir* クローンの多くは、現在データベース上にない *nirS* および *nirK* 配列であったことから、16S rRNA 遺伝子と *nir* 遺伝子の解析結果を相互評価することは困難であった。また、検出された *nir* クローンの多様性を比較するために、Rarefaction 解析を行ったところ、メタノールを資化した微生物群集における *nirS* および *nirK* の多様性は著しく低かった。これまで、土壌や海洋中において *nirK* の多様性は、*nirS* よりも低いと報告されてきたが、実際に活性汚泥内で活性を示す酢酸およびメタノール資化性脱窒細菌の *nirS* および *nirK* の多様性は同等であることが示された。

第4章では、SIP 解析の特徴の一つでもある炭素のクロスフィーディング（添加した  $[^{13}\text{C}]$ -基質の1次消費者の中間代謝産物・副産物により、他の消費者が  $^{13}\text{C}$  標識される）を利用することで、メタン酸化細菌と脱窒細菌の共存機構を明らかにし、メタン脱窒反応を進行させるメカニズムの検証を行った。本実験では、 $[^{13}\text{C}]$ -メタンを唯一の炭素源として硝酸塩含有培地に懸濁した下水処理場の汚泥の回分培養を行った。メタン脱窒反応系の  $[^{13}\text{C}]$ -DNA 画分より作成した 16S rRNA 遺伝子のクローンライブラリーを解析した結果、メタンの一次消費者は  $\gamma$ -Proteobacteria に属する未分離のメタン酸化細菌（*Methylocaldum* 属に近縁なグループ）であると特

定した。また、メタン酸化細菌以外の細菌も検出されたことから、メタン由来の炭素のクロスフィーディングが確認された。特に *Hyphomicrobiaceae* 科の細菌が多く検出されたことから、メタン脱窒反応場において、主要な脱窒細菌に供給されている主な電子供与体はメタノールやギ酸（メタン酸化反応系の中間代謝産物）などのC1化合物であることが示唆された。また、従属栄養性脱窒（炭素源：メタノール）では、投入硝酸態窒素量の約90%が系外に脱窒されるのに対し、メタン脱窒反応では投入硝酸態窒素の約40%が系外に脱窒され、残り約60%が同化により汚泥として変換されることも明らかとなった。

第5章では、酢酸ナトリウムまたはメタノールを炭素源として集積培養した脱窒生態系を対象に、塩濃度を段階的に増加させたときの脱窒性能および微生物群集構造について解析した。メタノール流加系においては塩濃度4%で脱窒性能が著しく低下したが、酢酸ナトリウム流加系では塩濃度10%においても高い窒素除去率を維持できることから、高塩濃度条件下での脱窒を達成するうえで、電子供与体として酢酸ナトリウムを用いる有用性が明らかとなった。つぎに、16S rRNA 遺伝子クローンライブラリー法と Terminal-restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) 解析により、塩濃度と微生物群集構造の関係解析を行った。高塩濃度条件下でも脱窒性能を維持した酢酸流加リアクターにおいては、塩濃度の上昇とともにリアクター内の細菌優占種が *Azoarcus* 属から *Halomonas* 属と *Marinobacter* 属に遷移することが明らかとなった。これまでに、*Halomonas* 属および *Marinobacter* 属の耐塩性に関する報告が多いことから、これら2つの属の細菌が高塩濃度条件下での脱窒を担っていることが考えられた。一方、メタノール流加リアクターは、*Hyphomicrobium* 属や *Methylophaga* 属などの微生物群で構成されていたが、塩濃度の上昇に伴う微生物群集構造の大きな変遷は見られなかった。この結果から、高塩濃度耐性を持ったメタノール資化性脱窒細菌が現れなかったために活性が低下することが示唆された。以上の群集構造解析の結果、高塩濃度の無機性排水からの脱窒を達成するうえで、電子供与体の選定が脱窒性能および安定性に極めて重要な影響を与えることを明らかにした。

第6章では、本論文の総括および展望を示した。

以上、本論文では、SIP法を導入した微生物生態解析により、同化反応を利用した“生物活性”、および脱窒酵素遺伝子群を指標とした“生物機能”という観点で、排水処理プロセスにおける脱窒生態系を明らかにした。また、未解明であったメタン脱窒反応場におけるメタン酸化細菌とその代謝産物を利用する脱窒細菌との相互関係をSIP解析により明らかにした。さらに、電子供与体の種類および塩濃度が脱窒細菌群集に大きな影響を与えることも明らかとなった。これらの成果は、生物学的窒素除去プロセスの開発および微生物生態学の進展に大いに貢献するものである。

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

氏名 大坂利文 印

(2007年11月 現在)

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
論文	<p>○ (1)(報文) <u>Toshifumi Osaka</u>, Sachiko Yoshie, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, Norio Iwami and Yuhei Inamori Identification of acetate- or methanol-utilizing bacteria under nitrate-reducing conditions by stable-isotope probing <i>Microbial Ecology</i>, 52, 253-266 (2006)</p> <p>○ (2)(報文) <u>Toshifumi Osaka</u>, Yoshitaka Ebie, Satoshi Tsuneda, and Yuhei Inamori Identification of the bacterial community structure involved in methane-dependent denitrification in a sewage treatment system by using DNA stable-isotope probing <i>FEMS Microbiology Ecology (revised)</i></p> <p>○ (3)(報文) <u>Toshifumi Osaka</u>, Kousuke Shirotani, Sachiko Yoshie, and Satoshi Tsuneda The effect of salinity concentration on the denitrifying activity and bacterial population in the wastewater treatment systems <i>Water Research (submitted)</i></p>
総説	<p>青井議輝, <u>大坂利文</u>, 常田聡 窒素除去プロセスにおける複合微生物系解析とその利用 <i>水環境学会誌</i>, 28(8), 474-478. (2005)</p> <p>近藤貴志, <u>大坂利文</u>, 青井議輝, 常田聡 生物学的窒素・リン除去プロセスにおける微生物生態と機能 <i>用水と廃水</i>, 48(1), 53-60 (2005)</p>
講演	<p>国際学会 (1) <u>Toshifumi Osaka</u>, Yoshitaka Ebie, Satoshi Tsuneda, and Yuhei Inamori Identification of bacterial population involved in the methane oxidation-coupled nitrate depletion under oxygen-limited conditions by using stable-isotope probing <i>107th American Society for Microbiology General Meeting</i>, Toronto, 21-25 May, (2007)</p> <p>(2) <u>Toshifumi Osaka</u>, Satoshi Tsuneda, Yoshitaka Ebie, and Yuhei Inamori Use of stable-isotope probing approach to identify active bacteria in methane-dependent denitrifying consortia. <i>11th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-11)</i>, Vienna, 20-25 August, (2006)</p> <p>(3) <u>Toshifumi Osaka</u>, Sachiko Yoshie, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, and Yuhei Inamori Identification of active denitrifying population in activated sludge by stable-isotope probing <i>8th Symposium on Bacterial Genetics and Ecology (BAGECO-8)</i>, Lyon, August 26-29, (2005)</p>

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>（国際会議続き）</p> <p>(4) <u>Toshifumi Osaka</u>, Sachiko Yoshie, Satoshi Tsuneda, Akira Hirata, and Yuhei Iamori Identification of active denitrifying population in activated sludge using stable-isotope-probing (SIP) <i>10th International Symposium on Microbial Ecology (ISME-10)</i>, Cancun, 22-27 August, (2004)</p> <p>国内学会</p> <p>(1) 大坂利文, 横澤和哉, 常田聡, 蛭江美孝, 稲森悠平, 井坂和一 有機系排水流入時における Anammox 反応場の処理性能および細菌群集構造の変化 日本水処理生物学会第44回大会, 富山, 2007年11月</p> <p>(2) <u>大坂利文</u> 排水処理プロセスにおける脱窒生態の分子生態解析 第10回日本水環境学会シンポジウム（オルガノセッション）, 熊本, 2007年9月</p> <p>(3) <u>Toshifumi Osaka</u>, Yoshitaka Ebie, Satoshi Tsuneda, and Yuhei Inamori Characterization of denitrifying bacterial community by using <math>^{15}\text{N}</math>-stable isotope probing 日本微生物生態学会第23回大会, 愛媛, 2007年9月</p> <p>(4) <u>大坂利文</u>, 蛭江美孝, 常田聡, 稲森悠平 メタン脱窒反応場における炭素循環と細菌群集構造 第41回日本水環境学会年会, 大阪, 2007年3月</p> <p>(5) 稲森悠平, 横澤和哉, <u>大坂利文</u>, 常田聡, 井坂和一 有機物が嫌気性アンモニア酸化反応場へ及ぼす影響 第41回日本水環境学会年会, 大阪, 2007年3月</p> <p>(6) <u>大坂利文</u>, 蛭江美孝, 常田聡, 稲森悠平 Stable-Isotope Probing法によるメタン脱窒反応場の細菌群集構造解析 日本水処理生物学会第43回大会, 宮城, 2006年11月</p> <p>(7) 稲森悠平, 横澤和哉, <u>大坂利文</u>, 常田聡, 井坂和一 有機物存在下における嫌気性アンモニア酸化反応の特性解析 日本水処理生物学会第43回大会, 宮城, 2006年11月</p> <p>(8) <u>大坂利文</u>, 蛭江美孝, 常田聡, 稲森悠平 Stable-Isotope Probing 法で見るメタン脱窒反応場の細菌群集 日本微生物生態学会第22回大会, 東京, 2006年10月</p> <p>(9) <u>大坂利文</u>, 蛭江美孝, 常田聡, 稲森悠平 メタン資化細菌を導入した窒素除去の機能強化と高度効率化システム導入方策 第9回日本水環境学会シンポジウム, 東京, 2006年9月</p>

## 早稲田大学 博士（工学） 学位申請 研究業績書

種 類 別	題名、 発表・発行掲載誌名、 発表・発行年月、 連名者（申請者含む）
講演	<p>（国内学会続き）</p> <p>(10) <u>大坂利文</u>、吉江幸子、常田聡、稲森悠平          活性汚泥内における高活性な脱窒細菌群集構造解析のための Stable-isotope probing 法の適用          日本水処理生物学会第42回大会、静岡、2005年11月</p> <p>(11) <u>大坂利文</u>、吉江幸子、常田聡、平田彰、稲森悠平          炭素利用特性に着目した活性汚泥における脱窒細菌群集構造解析－SIP法を導入した16S rRNA 遺伝子および機能遺伝子解析－          第39回日本水環境学会年会、千葉、2005年3月</p> <p>(12) <u>大坂利文</u>、吉江幸子、常田聡、平田彰、稲森悠平          Stable-isotope probing法を用いたアクティブな脱窒細菌の特異的検出          日本微生物生態学会第20回大会、仙台、2004年11月</p> <p>(13) <u>大坂利文</u>、吉江幸子、常田聡、平田彰、稲森悠平          活性汚泥に存在するメタノール資化性細菌群の SIP 法による特定          日本水処理生物学会第41回大会、つくば、2004年11月</p> <p>(14) <u>大坂利文</u>、吉江幸子、常田聡、平田彰、稲森悠平          SIP 法によって明らかとなった活性汚泥中のアクティブな脱窒細菌－メタノールと酢酸を添加した場合の違い－          第38回日本水環境学会年会、札幌、2004年3月</p> <p>(15) <u>大坂利文</u>、吉江幸子、常田聡、平田彰、稲森悠平          基質資化特性と亜硝酸還元酵素遺伝子に基づいた群集構造解析          日本水処理生物学会第40回大会、熊本、2003年11月</p> <p>(16) <u>大坂利文</u>、吉江幸子、常田聡、平田彰、稲森悠平          Stable-isotope probing(SIP)法を利用した脱窒細菌群集構造解析          日本微生物生態学会第19回大会、大阪、2003年10月</p> <p>(17) <u>大坂利文</u>、吉江幸子、常田聡、平田彰、稲森悠平          分子生物学的手法を導入した脱窒細菌の基質資化特性に基づいた群集構造解析          第37回日本水環境学会年会、熊本、2003年3月</p> <p>(18) <u>大坂利文</u>、吉江幸子、常田聡、平田彰、稲森悠平          分子生物学的手法を用いた排水処理プロセスにおける脱窒細菌の解析          日本水処理生物学会第39回大会、大宮、2002年11月</p>